中华按蚊谷胱甘肽-S-转移酶 E6(AsGSTE6)的表达纯化与结晶

苗　娅, 张甜甜, 许柏英*, 陈　斌*

(重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所, 媒介昆虫重庆市重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】对中华按蚊 *Anopheles sinensis* 谷胱甘肽-S-转移酶 E6(AsGSTE6)进行初步晶体学研究,为深入研究其空间结构奠定基础。【方法】利用生物信息学软件,首先对中华按蚊 AsGSTE6 进行生物信息学预测和分析;然后进行分子克隆,构建重组子 pET28a-*AsGSTe*6;利用大肠杆菌 *Escherichia coli* 原核表达系统进行诱导表达;采用 Ni-NTA 金属螯合层析和葡聚糖凝胶层析的方法对重组蛋白进行纯化;通过葡聚糖凝胶层析和化学交联的结果分析蛋白的聚合状态;运用坐滴蒸气扩散法对重组蛋白进行结晶筛选。【结果】生物信息学分析结果表明,AsGSTE6 分子量为 25.28 kD,无信号肽和跨膜区,是亲水性蛋白;三级结构预测结果显示,AsGSTE6 主要由一个小的 βαβαββα 折叠模式的 N 端结构域和一个大的全螺旋的 C 端结构域组成。多重序列比对结果表明,在不同昆虫中 GSTE6 具有高度保守性。分子克隆得到中华按蚊 AsGSTE6 的编码基因 *AsGSTe*6 序列,大小为 672 bp。在大肠杆菌中 AsGSTE6 主要在上清中有大量表达,为可溶性表达;通过镍柱亲和层析和凝胶过滤层析纯化出了高纯度且稳定的 AsGSTE6 重组蛋白;凝胶过滤层析结合化学交联的结果证实体外纯化的融合蛋白 AsGSTE6 主要呈二聚体状态;通过晶体筛选获得了 AsGSTE6 的晶体。【结论】运用结晶学的方法获得了 AsGSTE6 的晶体,这为后续解析 AsGSTE6 的三维结构奠定了基础。

关键词: 中华按蚊; 谷胱甘肽-S-转移酶; AsGSTE6; 原核表达; 纯化; 结晶

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2018)01-0059-09

Expression, purification and crystallization of the glutathione-S-transferase E6 (AsGSTE6) from *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae)

MIAO Ya, ZHANG Tian-Tian, XU Bo-Ying*, CHEN Bin* (Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, Institute of Insect and Molecular Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract:【Aim】This study aims to explore the structure of the glutathione-S-transferase E6 (AsGSTE6) from *Anopheles sinensis* based on its preliminary crystallography.【Methods】AsGSTE6 was predicted and analyzed by bioinformatics method. *AsGSTe*6 was cloned, and the recombinant plasmid pET28a-*AsGSTe*6 was constructed and expressed in prokaryotic expression system. The recombinant protein was purified with nickel chelate affinity chromatography and gel filtration chromatography. The polymerization state of AsGSTE6 was detected by gel filtration chromatography and chemical crosslinking analysis. Crystal screening was performed by sitting drop vapor diffusion techniques.【Results】Bioinformatic analysis revealed that AsGSTE6 is a hydrophilic protein with the calculated molecular weight of 25.28 kD, without transmembrane regions and signal peptides in the amino acid sequence. The

基金项目: 重庆市基础与前沿研究计划项目(cstc2015jcyjBX0142, cstc2016jcyjA0375); 重庆师范大学博士启动项目(15XLB009); 国家自然科学基金项目(31672363, 31372265); 国家科技基础性工作专项重点项目(2015FY210300); 广西科技重大专项(桂科 AA17129002)

作者简介: 苗娅, 女, 1992 年 5 月生, 贵州贵阳人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: 1427726145@qq.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: xbywh@126.com; c_bin@hotmail.com

收稿日期 Received: 2017-09-25; 接受日期 Accepted: 2017-12-15

3D structural prediction showed that AsGSTE6 contains a small N-terminal domain following a βαβαββα pattern and a large C-terminal all-α domain. The result of multiple sequence alignment demonstrated that GSTE6 proteins are highly conserved in insects. The 672 bp coding sequence of *AsGSTe6* was cloned, and the recombinant plasmid pET28a-*AsGSTe6* was constructed correctly. The recombinant protein AsGSTE6 was expressed in soluble form in *Escherichia coli*. And then the highly purified and stable protein was obtained with two step affinity chromatography. Gel filtration chromatography and chemical crosslinking analysis showed that AsGSTE6 mainly existed as dimer *in vitro*. Finally, the protein crystals of AsGSTE6 were obtained by crystal screening. 【Conclusion】Crystals of AsGSTE6 have been obtained by methods of crystallography, which lays the foundation for 3D structure determination of AsGSTE6.

Key words: *Anopheles sinensis*; glutathione-S-transferases; AsGSTE6; prokaryotic expression; purification; crystallization

蚊虫是世界上最致命的动物类群,它们能够传播多种人类疾病,目前人类对蚊虫的控制仍主要是施用杀虫剂。1955 年世界卫生组织决定,通过喷洒 DDT 在全球根除疟疾(刘斯璐等, 2011)。虽然传疟蚊虫得到了有效控制,但由于不加节制大面积地滥用 DDT,导致蚊虫抗药性的产生。当换用有机磷杀虫剂、拟除虫菊酯、氨基甲酸酯等其他杀虫剂时,蚊虫的抗药性也急剧增强(田永清和徐汉虹, 2003; 吕敏等, 2003)。为了有效地控制蚊虫,人类急切地想弄清蚊虫抗药性的机制以及合理的抗性治理策略,只有这样才能预防并开发新的药物来控制传播疾病的媒介蚊虫。

目前的研究表明,蚊虫的抗药性有几种——行为抗性、生理抗性、生化抗性,其中生化抗性在蚊虫抗药性形成中起着主要作用,主要有两种机制:靶标位点不敏感性和代谢抗性(李永强, 2012; 阮成龙等, 2012)。蚊虫对异生质的代谢,其中一个重要步骤是通过二相酶催化活化后的异生质与内生的水溶性底物轭和,从而将难溶的异生质变得易溶低毒,如谷胱甘肽-S-转移酶催化谷胱甘肽与异生质的轭和(Sheehan *et al*., 2001)。

谷胱甘肽-S-转移酶是一类二聚体多基因家族的多功能蛋白,依据 GSTs 调节大部分特异性底物所具有的不同催化活性,将 GSTs 分为 Delta, Epsilon, Sigma, Omega, Theta, Zeta 家族和未知家族,其中 Delta 和 Epsilon 家族仅存在于昆虫中(Ding *et al*., 2003; Lumjuan *et al*., 2007)。AsGSTE6 即为中华按蚊 Epsilon 家族中的第 6 个成员(Enayati *et al*., 2005)。

中华按蚊 *Anopheles sinensis* 是传播疟疾和马来丝虫病等蚊媒病的重要媒介之一(Chang *et al*., 2014)。本研究以中华按蚊为研究对象,基于前期测序获得的中华按蚊基因组和转录组数据,以及中华按蚊 GST 基因在不同地区野外抗性与感性的表达谱数据,初步筛选出可能在中华按蚊杀虫剂抗性中起重要作用的 GST 基因 *AsGSTe6*。通过对其进行生物信息学分析、分子克隆、表达、纯化和初步的晶体初筛,旨在获得 AsGSTE6 的晶体,为后续解析 AsGSTE6 的晶体结构,在原子分辨率水平上直观分析 AsGSTE6 与底物杀虫剂的互作以及序列突变导致的影响,揭示 GST 参与代谢抗性的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 基因组、菌株、质粒和主要试剂

本实验所用中华按蚊饲养于重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所。大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)品系和原核表达载体 pET-28a 为本所自备保存,限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 为 TaKaRa 公司产品;10 × T4 Buffer 和 Fast Pfu 酶为 Fermentas 公司产品;高纯度质粒小提试剂盒和快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为北京康为世纪生物科技有限公司产品;RNA 反转录试剂盒(First strand cDNA Synthesis Kit)是 Thermo Scientific 公司产品;Ni-NTA 亲和层析柱空柱、超滤管购自上海生工生物工程技术服务有限公司;分子筛 HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR 购自 GE Healthcare 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 中华按蚊 *AsGSTe6* 的克隆与序列特征分析

中华按蚊基因组序列测自于重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所,中华按蚊 *GSTe6* 基因序列是基于本所测得的中华按蚊基因组数据分析而得。

使用在线软件 ExPASy 中的 ProtParam (http://

web. expasy. org/protparam/)，分析 AsGSTE6 氨基酸序列得出蛋白质的分子量、等电点、吸光值等理化性质；AsGSTE6 蛋白的信号肽预测使用 SignalP4. 1 在线软件（http：// www. cbs. dtu. dk/services/SignalP/）；AsGSTE6 蛋白质跨膜区的预测使用 TMHMM 在线软件（http：// www. cbs. dtu. dk/services/TMHMM/）；疏水区使用 ProtScale 在线软件（http：// www. expasy. org/cgi-bin/protscale. pl）预测；通过 SSPro4. 0 在线软件（https：// npsa-prabi. ibcp. fr/NPSA/npsa_seccons. html）对 AsGSTE6 蛋白的二级结构进行预测；蛋白三级结构通过 SWISS-MODEL 在线软件（https：// swissmodel. expasy. org/interactive）预测；AsGSTE6 与其他物种同源序列的比对分析采用在线比对工具 Multalin（http：// multalin. toulouse. inra. fr/multalin/）及 ESPript 3. 0（http：// espript. ibcp. fr/ESPript/cgi-bin/ESPript. cgi）完成。

1.3　重组质粒的构建

根据分析获得的 *AsGSTe6* 基因的编码区序列，采用 Primer Premier5. 0 软件设计引物：上游 P1：5′-CGCGGATCCATGTCTCGCAAGCAACCGAT-3′（下划线部分为 *Bam*H Ⅰ 酶切位点），下游 P2：5′-CCCAAGCTTTCATTTGTTGCTCGCTTGAC-3′（下划线部分为 *Hin*d Ⅲ酶切位点）。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

提取中华按蚊总 RNA，反转录为 cDNA，以此 cDNA 为模板，P1 和 P2 为引物扩增 *AsGSTe6* 的基因序列。PCR 扩增体系 25 μL：5 × buffer 5 μL，2. 5 μmol/L dNTPs 2 μL，10 μmol/L P1 和 P2 各 1 μL，5 U/μL Fast pfu 酶 0. 5 μL，ddH$_2$O 15. 5 μL。PCR 扩增条件：95℃ 预变性 5 min；95℃ 45 s，60℃ 45 s，72℃ 1. 5 min，共 30 个循环；最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定分析，切胶回收目的片段。

将 PCR 回收产物与表达载体 pET-28a 分别经 *Bam*H Ⅰ 和 *Hin*d Ⅲ 双酶切并回收后，用 T4 DNA 连接酶于 4℃ 连接过夜。连接产物转化至大肠杆菌感受态 TOP10 细胞中，经卡那霉素抗性筛选，挑选阳性单菌落，进行菌液 PCR 和双酶切鉴定。鉴定正确的质粒 pET28a-*AsGSTe6* 送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.4　AsGSTE6 重组蛋白的检测表达和纯化

将构建成功的重组质粒转化到大肠杆菌 BL21（DE3）感受态细胞中，37℃ 200 r/min 于摇床培养 45 min 后，将菌液全部加入 3 mL 含有卡那霉素（0. 06 mg）的 2 × YT 培养基中过夜培养。吸取 0. 5 mL 过夜培养的菌液接种于 10 mL 含有卡那霉素（0. 3 mg）的 2 × YT 培养液中，待菌体 OD$_{600}$ 值培养到达 0. 6 ~ 0. 8 时，加入 10 μL IPTG（0. 2 mol/L），分别在 37℃ 和 16℃ 下诱导表达 4 h 和 20 h。诱导表达结束后，4 000 r/min 离心 10 min，倒掉培养液，将沉在管底的菌液用 1 mL Buffer（20 mmol/L Tris-HCl，200 mmol/L NaCl，pH 8. 5）吹吸均匀。超声破碎（功率 400 W，超声 2 s，间歇 3 s，工作 10 min）后，12 000 r/min 离心 10 min，分别收集上清和沉淀，进行 SDS-PAGE 分析。

依据摸索的蛋白表达条件，对 AsGSTE6 蛋白进行过量表达后，16℃ 7 000 r/min，离心 10 min 收菌。接着每 500 mL 菌体加入 30 mL 预冷的重悬菌体缓冲液（20 mmol/L Tris-HCl，200 mmol/L NaCl，pH 8. 5）吹吸均匀无块状，将菌液用液氮反复冻融 3 次后，冰浴超声破碎（功率 400 W，超声 1 s，间歇 3 s，工作时间 30 min）。结束后 12 000 r/min 4℃ 离心 30 min，取上清进行镍柱纯化。首先用结合缓冲液（20 mmol/L Tris-HCl，200 mmol/L NaCl，pH 8. 5）平衡镍柱，上样后，分别用体积均为 10 mL，含浓度为 0，10，20，50，100，250 和 500 mmol/L 咪唑的结合缓冲液分别洗脱上清蛋白；取流穿样品进行 SDS-PAGE 分析，找出洗脱杂蛋白的适宜咪唑浓度。摸索出合适的咪唑梯度洗脱杂蛋白后，最终用含 500 mmol/L 咪唑的结合缓冲液洗脱目的蛋白。

将最后洗脱的 AsGSTE6 蛋白采用凝胶过滤层析法（也称分子筛层析，SEC）进行精细纯化。即用 HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR 层析柱纯化，纯化所用缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl，200 mmol/L NaCl，pH 8. 5。分步收集蛋白样品。根据蛋白大小和出峰位置比对，收取目的蛋白进行 SDS-PAGE 检测。

1.5　蛋白聚合状态的化学交联法测定

化学交联是在蛋白质样品中加入适量的化学交联剂（chemical cross-linker）使蛋白质内部或不同蛋白质之间发生交联反应，形成稳定的蛋白-蛋白相互作用。其中，甲醛（formaldehyde）是一种常用的化学交联剂，为了验证目的蛋白 GSTE6 在体外可能的聚集形式，我们选择甲醛作为交联剂来验证猜测，具体方法如下：

化学交联法分为 4 个小组，每个小组含 2 个 1. 5 mL 离心管，即 1 号和 2 号管，在所有的 1 号管

中加入 20 μL 0.48 mg/mL 的 AsGSTE6 蛋白和 20 μL PBS 缓冲液，所有的 2 号管中加入 20 μL 0.48 mg/mL 的 AsGSTE6 蛋白和 20 μL 2% 的甲醛，均放入 25℃ 恒温水浴锅中水浴加热，第 1 组加热 10 min，第 2 组加热 30 min，第 3 组加热 60 min，第 4 组加热 120 min，每组反应到时间后，加入 0.8 μL 1 mol/L Tris-HCl，pH 8.0 和 8 μL 蛋白上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 检测，上样量为 15 μL。

1.6 AsGSTE6 蛋白质的结晶

利用超滤管（截流大小 10 kD）将分子筛纯化后的 AsGSTE6 蛋白浓缩至 10 mg/mL，使用 Hampton Research 公司的结晶试剂盒 Index™-HR2-144 (Index)，Crystal Screen™-HR2-110 (Kit Ⅰ) 和 Crystal Screen 2™-HR2-112 (Kit Ⅱ)，在 16℃ 恒温条件下采用坐滴气相扩散法进行晶体初筛，即在 96 孔坐滴结晶板中加入 100 μL 结晶下槽液，上样孔中加入 1 μL AsGSTE6 蛋白，再加入 1 μL 相对应的下槽液进行覆盖，密封后于 16℃ 静置培养。

2 结果

2.1 AsGSTE6 的生物信息学分析

2.1.1 理化性质分析：使用 ExPASy 蛋白组学分析软件中的 Translate 软件（http://web.expasy.org/translate/）将该 cDNA 序列转化成氨基酸序列，通过 Translate 软件，输入 AsGSTE6 氨基酸序列（http://web.expasy.org/protparam/）可以得出 AsGSTE6 的理化性质（表 1），其中在 AsGSTE6 的氨基酸中，亮氨酸（Leu）最多，出现了 30 次，占总编码氨基酸次数的 13.5%。

表 1 AsGSTE6 理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of AsGSTE6

理化性质 Physico-chemical properties	预测结果 Predicted outcome
分子式 Molecular formula	$C_{1136}H_{1822}N_{310}O_{331}S_5$
分子质量 Molecular weight (kD)	25.28
氨基酸数 Number of amino acids	223
等电点 Isoelectric point	7.76
吸光值 Absorbance (0.1%)	氧化型 Oxidized form: 0.694 还原型 Reduced form: 0.689
负电荷残基 Asp + Glu	27
正电荷残基 Arg + Lys	28
平均亲水系数 Average hydrophilicity	-0.093
不稳定系数 Instability index	42.99
脂肪系数 Aliphatic index	105.43

对 AsGSTE6 氨基酸序列，使用 ExPASy 蛋白组学分析在线软件分析，得出该蛋白质无信号肽，无跨膜区，无明显疏水区，为亲水性蛋白。

2.1.2 AsGSTE6 与其同源序列的多重比对：经 NCBI Blast 比对后发现，AsGSTE6 与冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* GSTE1（GenBank 登录号：AAL59655.1）、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* GSTD3（GenBank 登录号：AIB07714.1）、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* GSTE1（GenBank 登录号：NP_611323.1）、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* GST1（GenBank 登录号：XP_966966.2）、家蝇 *Musca domestica* GST1（GenBank 登录号：XP_005183763.1）、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemli* GST1（GenBank 登录号：ABK20175.1）、小菜蛾 *Plutella xylostella* GST3（GenBank 登录号：AAC35245.1）、家蚕 *Bombyx mori* GSTE5（GenBank 登录号：NP_001108464.1）、东亚飞蝗 *Locusta migratoria* GSTE1（GenBank 登录号：AHC08046.1）的氨基酸序列一致性分别为 69%，33%，40%，36%，39%，36%，34%，37% 和 36%。将这些相似性较高物种的氨基酸序列在线比对后获得 GSTE6 氨基酸多重序列比对图（图 1）。结果发现它们的保守性较高，并且稳定 GSH 结合位点的残基（Ser14，Pro15，His43 等）和直接结合 GSH 的关键残基（Ile57，Asp69，Ser70 等）都较保守。而依据冈比亚按蚊推测的结合杀虫剂 DDT 的关键残基（Ser106，Ala111，Leu113，Arg114 等）也相对保守（Wang *et al*., 2008）。

2.1.3 结构预测：对 AsGSTE6 蛋白运用 PSIPRED v3.3 在线软件进行二级结构预测，结果表明，AsGSTE6 蛋白 α-螺旋占 40.36%，延伸链占 11.21%，无规则卷曲占 48.43%。通过在 RCSB Protein Data Bank 网站中在线搜索，找出冈比亚按蚊的一个 AgGSTE2（PDB：2IL3）（Wang *et al*., 2008）与 AsGSTE6 的同源性最高，序列一致性是 90/199（45%）。选取 AgGSTE2 的结构作为同源建模的模板，通过 SWISS-MODEL 同源建模，预测得到 AsGSTE6 蛋白质的三级结构（图 2）。AsGSTE6 包含 223 个残基，被分为两个不同的结构域和一个连接区，即一个小的 N 端即氨基端结构域（第 1 - 80 位残基），一个连接区域（第 81 - 91 位残基）和一个大的 C 端即羧基端结构域（第 92 - 223 位残基）。N 端结构域采取的是一个 βαβαββα 折叠模式，由位于中心的 4 个混合 β-折叠片组成，它的一侧是 H1 和 H3 螺旋，另一侧是 H2 螺旋，其中 B3 反向平行于

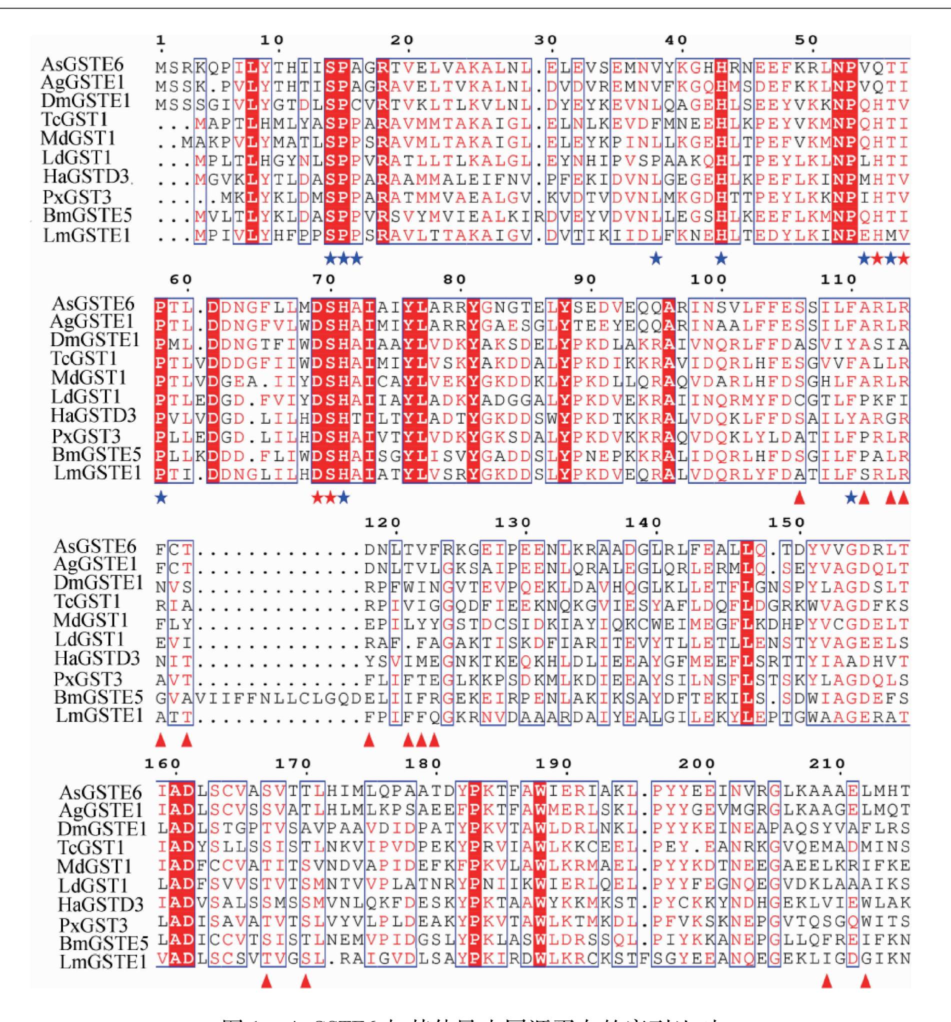


图 1　AsGSTE6 与其他昆虫同源蛋白的序列比对

Fig. 1　Multiple sequence alignment of AsGSTE6 with homologous proteins from other insects

蛋白来源及其 GenBank 登录号 Origin species of proteins and their GenBank accession numbers：中华按蚊 *Anopheles sinensis*；冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*（AAL59655.1）；黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（NP_611323.1）；赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（XP_966966.2）；家蝇 *Musca domestica*（XP_005183763.1）；马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*（ABK20175.1）；棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（AIB07714.1）；小菜蛾 *Plutella xylostella*（AAC35245.1）；家蚕 *Bombyx mori*（NP_001108464.1）；东亚飞蝗 *Locusta migratoria*（AHC08046.1）. 红五星表示 GSH 结合位点的关键残基，蓝五星表示稳定 GSH 结合位点的残基，红三角表示推测的 DDT 结合位点的关键残基，高度保守的氨基酸残基显示为红色。The key residues of binding sites of GSH are marked with red asterisks. The residues stabilizing the GSH-binding sites are marked with blue asterisks. The putative key residues of binding sites of DDT are denoted by red triangles. Highly conserved residues are colored in red.

B1，B2 和 B4。C 端结构域由一个 5 股右手螺旋束构成，即螺旋 H4，H5，H6，H7 和 H8，其中螺旋 H4 于 H5 的反平行位置。

2.2　*AsGSTe6* 基因的克隆和重组表达质粒的鉴定

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析，可见在约 500 ~ 750 bp 之间有特异性条带，大小与预期(672 bp)相符。将菌液 PCR 鉴定正确的重组表达质粒经 *Bam*H Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切鉴定，可见约 672 bp 的目的基因片段。测序结果正确，表明重组表达质粒 pET28a-*AsGSTe6* 构建正确。

2.3　AsGSTE6 重组表达产物的鉴定

AsGSTE6 重组表达产物经 SDS-PAGE 分析显示，在 37℃ 和 16℃ 下诱导的菌体在约 25 kD 处均有大量的蛋白表达，且是在蛋白上清中有表达，表明目的蛋白是以可溶性形式表达，故下一次可在 37℃ 下诱导重组蛋白表达。

2.4　重组蛋白 AsGSTE6 的纯化

配制不同咪唑梯度洗脱杂蛋白，通过 SDS-PAGE 分析，可以看出在 25.0 kD 附近有明显的条带，大小与预期的 25.28 kD 相符，可以得出对于 His_6-GSTE6 来说，镍柱粗纯化的条件可设置为 20 mL 结合缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.5，200 mmol/L NaCl)和 30 mL 含 20 mmol/L 咪唑的结合缓冲液洗脱杂蛋白，最后 6 mL 含 500 mmol/L 咪唑的结合缓冲液洗脱目的蛋白(图 3)。

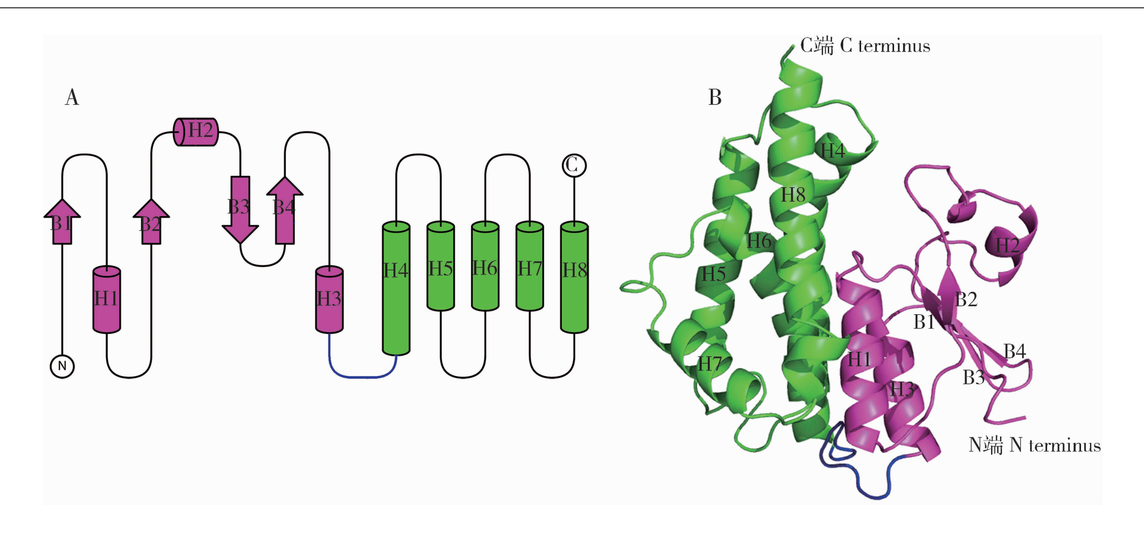


图 2 预测的 AsGSTE6 三级结构的拓扑图(A)和飘带图(B)

Fig. 2 The predicted topology structure (A) and ribbon diagram (B) of AsGSTE6

氨基端的结构域用品红表示,羧基端的结构域用绿色表示,两个结构域间的连接区用蓝色表示,H 表示 α 螺旋,B 表示 β 折叠。The N-terminal domain is colored in magenta and C-terminal domain in green, the linker between the two domains is colored in blue, H represents α-helix and B represents β-strands.

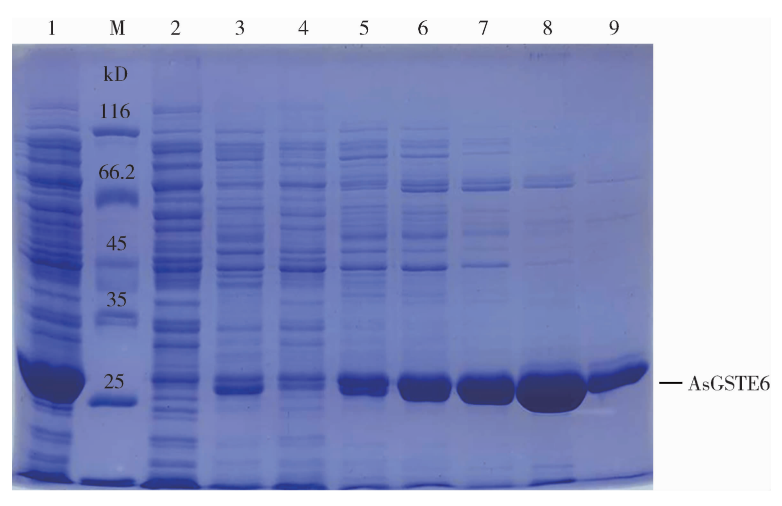


图 3 重组蛋白 AsGSTE6 的镍柱纯化

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein AsGSTE6 after Ni-NTA

M: 蛋白分子量标准物 Protein molecular weight marker; 1: 超声破碎后的上清 Supernatant after ultrasonication; 2: 蛋白上清过柱后的流穿液 The flow-through solution of supernatant after column binding; 3: 结合缓冲液过柱后的洗脱液 Eluent of binding buffer after column binding; 4 -9: 分别含 10, 20, 50, 100, 250 和 500 mmol/L 咪唑的结合缓冲液过柱后的洗脱液 Eluant of binding buffer containing 10, 20, 50, 100, 250 and 500 mmol/L imidazole after column binding, respectively.

将通过 Ni-NTA 洗脱的目的蛋白进行 Sephacryl™ S-200HR 凝胶层析纯化,凝胶层析图谱显示,在 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 200 mmol/L NaCl 的条件下,目的蛋白纯化效果较好,以单峰形式存在,对称性较好,说明纯化后的 AsGSTE6 蛋白聚合状态很均一。大约在 60 mL 位置左右出峰,估计其为二聚体(图 4: A)。根据分子筛的出峰位置选取第 41 ~48 号管的蛋白,通过 SDS-PAGE 分析表明,纯化后的重组蛋白纯度较高,几乎没有杂蛋白(图 4: B)。

2.5 AsGSTE6 的化学交联

从分子筛纯化结果我们推测 AsGSTE6 为二聚体,为了进一步验证,我们做了化学交联实验,用 2% 甲醛交联摸索了不同的时间梯度,分别为 10, 30, 60 和 120 min,从交联结果可以看出,交联后溶液中 AsGSTE6 存在单体、二聚体和四聚体 3 种状态,但是随着交联时间的延长,单体和四聚体 AsGSTE6 的浓度越来越低,二聚体占比最高。由此猜测如果加大交联剂浓度并加长交联时间,AsGSTE6 在溶液中就确实是以二聚体的状态存在(图 5)。

A

Manual run 10:10 UV1 280 nm
Manual run 10:10 Fractions

60.09

紫外吸收值(mAU)
UV absorbance

体积 Volume (mL)

B

kD　M　1　2　3　4　5　6　7　8　9

116
66.2
45
35
25
18.4
14.4

图 4　重组蛋白 AsGSTE6 的分子筛层析图谱(A)和分子筛纯化后的 SDS-PAGE 分析(B)

Fig. 4　Molecular sieve chromatographic profile of the recombinant protein AsGSTE6 (A) and SDS-PAGE analysis after SEC (B)

A：分子筛层析图横轴表示层析体积(mL)，纵轴表示 280 nm 紫外吸收值(mAU)，分子筛图谱上有一个明显的主峰，峰尖位置为 60.09 mL (The horizontal axis represents the volume (mL) and the vertical axis represents the absorbance at 280 nm (mAU), and there was only one distinct peak in the chromatography, with the peak position at 60.09 mL). B：M：蛋白分子量标准物 Protein molecular weight marker; 1：过柱前的蛋白样品 AsGSTE6 before column binding; 2–9：AsGSTE6 分子筛层析纯化出峰对应的第 41～48 号管蛋白样品 The corresponding no. 41–48 fractions of AsGSTE6 tested by SDS-PAGE.

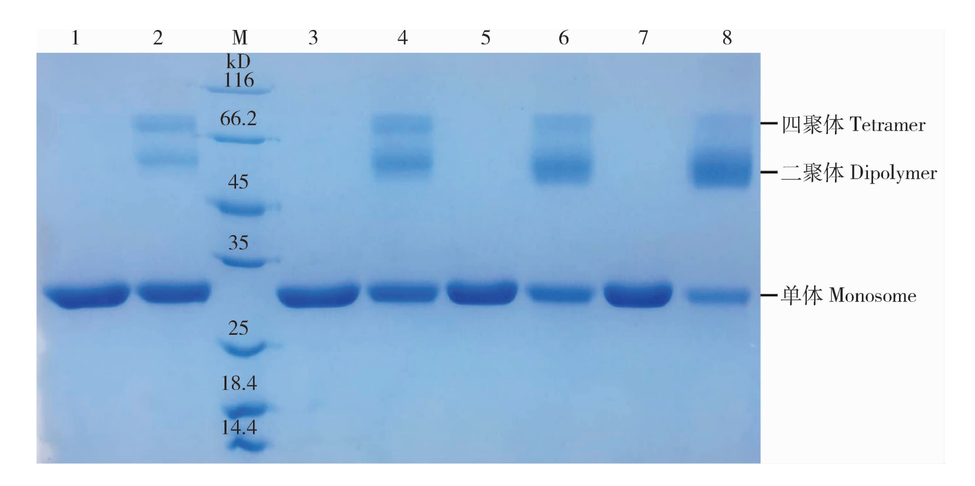


图 5　重组 AsGSTE6 蛋白的化学交联

Fig. 5　Chemical crosslinking of the recombinant AsGSTE6 protein

M：蛋白标准分子量 Protein molecular weight marker; 1, 3, 5, 7：AsGSTE6 不含甲醛在 25℃分别孵育 10, 30, 60 和 120 min (对照) AsGSTE6 without formaldehyde incubated at 25℃ for 10, 30, 60 and 120 min, respectively (CK); 2, 4, 6, 8：AsGSTE6 用 2% 甲醛 25℃交联 10, 30, 60 和 120 min (AsGSTE6 with 2% formaldehyde incubated at 25℃ for 10, 30, 60 and 120 min, respectively).

2.6　AsGSTE6 的蛋白结晶

将纯化后的 AsGSTE6 浓缩至约 12 mg/mL，在 Index™-HR2-144（Index），Crystal Screen™-HR2-110（Kit Ⅰ）和 Crystal Screen 2™-HR2-112（Kit Ⅱ）共 3 个结晶试剂盒的 192 个条件下进行晶体的筛选。其中在 Kit Ⅰ的 46 号条件（0.1 mol/L 二甲胂酸钠，0.2 mol/L 水合醋酸钙，18% w/v 聚乙二醇 8000）（图 6：A）和 Index 66 号条件［0.1 mol/L 双(2-羟甲基)氨基-三(羟甲基)甲烷 pH 5.5，0.2 mol/L 硫酸铵，25% w/v 聚乙二醇 3350］下出现的晶体较大（图 6：B）。重复这两个条件，同时用无蛋白的缓冲液作对照，结果只有蛋白结晶。尝试将 66 号条件下的晶体挑出送至上海光源衍射，分辨率能达到 3 Å，但由于数据衍射质量不高，未能解析结构。后续还需尝试各种条件提高晶体的衍射质量以收集数据解析晶体结构。

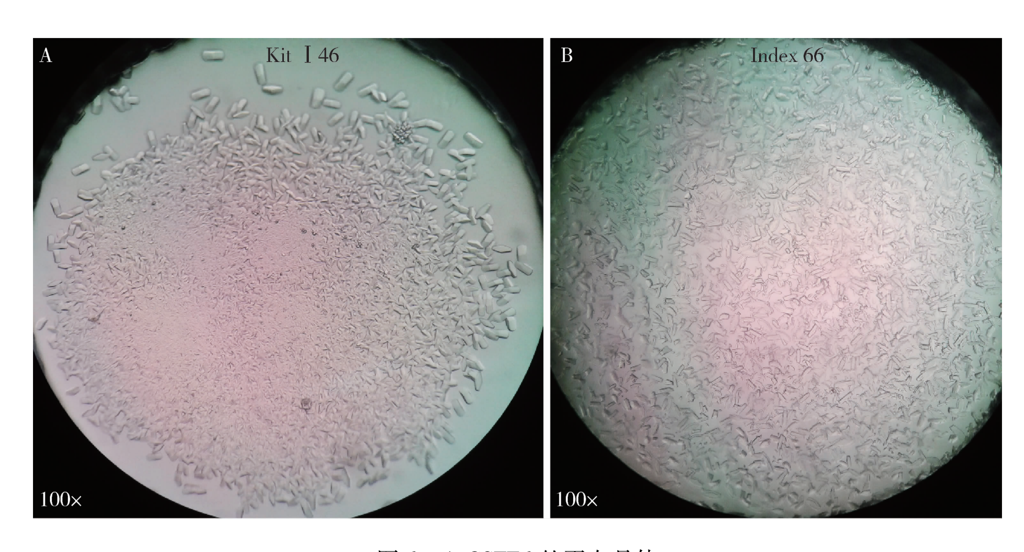


图 6　AsGSTE6 的蛋白晶体
Fig. 6　Crystals of AsGSTE6
A：Kit Ⅰ的 46 号条件长出的 AsGSTE6 蛋白晶体 Crystals of AsGSTE6 grown in the condition of Kit Ⅰ-46；B：Index 的 66 号条件长出的 AsGSTE6 蛋白晶体 Crystals of AsGSTE6 grown in the condition of Index-66.

3　讨论

蚊虫是传染病传播的主要媒介，为抑制蚊媒传染病的传播，施用杀虫剂是广泛使用的方法，但现如今很多蚊虫都出现抗药性的现象，因此，对蚊虫抗药性机制的研究也越来越受到人们的关注。GSTs 是广泛存在于植物、动物和好氧生物中的一类多功能家族酶，二聚体谷胱甘肽-S-转移酶位于 N 端和 C 端结构域的中间有一个独立的活性催化位点，该位点由谷胱甘肽结合位点（GSH binding site，G-site）和疏水底物结合位点（hydrophobic substrate bingding site，H-site）组成，G-site 和 H-site 组成一个完整的催化单元（Frova，2006）。根据目前的研究推测，GSTs 的 G-site 均有一个氨基酸残基与谷胱甘肽的巯基形成一对氢键使 GSH 的巯基变成活性负离子状态，从而进入激活状态，这样才能够与异生质反应。GST 的重要功能是通过催化还原型三肽谷胱甘肽（γ-glutamyl-glycine）GSH 的亲核进攻以代谢疏水性毒物如杀虫剂等。另外，GSTs 能非催化性地结合和转运大量内源和异生质化合物（Wang *et al*.，2008）。

中华按蚊是传播疟疾的主要媒介。为了研究 GSTs 介导其抗药性产生的机制，本研究通过对筛选出的参与中华按蚊抗药性的关键 GST 基因 *AsGSTe6* 进行生物信息学分析、分子克隆，在大肠杆菌原核表达体系中表达出有活性的 GST，并通过纯化获得高纯度的 AsGSTE6，最后结晶顺利获得了生长状态较好的晶体。虽然目前晶体的衍射质量还不理想，但后续可以通过尝试对目的蛋白的浓度、pH 值、结晶条件中沉淀剂的浓度、盐浓度和缓冲液的 pH、种类等多个条件进行优化来提高衍射分辨率。本工作为今后得到高分辨率的晶体并解析 AsGSTE6 的三维结构打下了基础。

在昆虫 GSTs 三维结构未知的情况下，酶与杀虫剂或天然底物的相互作用以及基因突变和序列多态性对抗性的影响等，这些在分子水平上是无法理解的。所以，基于 AsGSTE6 的空间结构，从结构生

物学的角度出发可直观清晰地阐释其代谢蚊虫杀虫剂的分子机制。鉴于本研究已成功获得单一的野生型 AsGSTE6 晶体,后续可以尝试将 AsGSTE6 与有机磷等杀虫剂进行共结晶,得到含有杀虫剂底物的复合物晶体更能彻底地从原子分辨率水平分析其代谢机理,并且基于分子结构识别天然底物,有望研制出更有效的杀虫剂进行蚊虫防控。总之,本研究为后续 AsGSTE6 晶体结构的解析奠定了基础,也为进一步深入探讨 AsGSTE6 介导中华按蚊代谢抗性的分子机制提供了基于结构生物学的新思路。

参考文献(References)

Chang XL, Zhong DB, Fang Q, Hartsel J, Zhou GF, Shi L, Fang FJ, Zhu CL, Yan GY, 2014. Multiple resistances and complex mechanisms of *Anopheles sinensis* mosquito: a major obstacle to mosquito-borne diseases control and elimination in China. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8(6): 1 – 11.

Ding YC, Ortelli F, Rossiter LC, Hemingway J, Ranson H, 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics*, 4(1): 1 – 16.

Enayati AA, Ranson H, Hemingway J, 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.*, 14(1): 3 – 8.

Frova C, 2006. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol. Eng.*, 23(4): 149 – 169.

Li YQ, 2012. Expression and Hydrolytic Activities of Carboxylesterases from *Helicoverpa armigera*. PhD Dissertation, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi. [李永强, 2012. 棉铃虫羧酸酯酶表达及解毒作用研究. 陕西杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文]

Liu SL, Cui F, Yan SG, Qiao CL, 2011. Investigation of organophosphate and pyrethroid resistance in vector mosquitoes in China. *Chin. J. Vector Biol. Control*, 22(2): 184 – 189. [刘斯璐, 崔峰, 燕帅国, 乔传令, 2011. 中国媒介蚊虫对有机磷类和拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性调查. 中国媒介生物学及控制杂志, 22(2): 184 – 189]

Lu M, Liu HX, Wu WJ, 2003. The relationship between of glutathione S-transferases and insect resistance. *Entomol. Knowl.*, 40(3): 204 – 207. [吕敏, 刘惠霞, 吴文君, 2003. 谷胱甘肽 S-转移酶与昆虫抗药性的关系. 昆虫知识, 40(3): 204 – 207]

Lumjuan N, Stevenson BJ, Prapanthadara L, Somboon P, Brophy PM, Loftus BJ, Severson DW, Ranson H, 2007. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 37(10): 1026 – 1035.

Ruan CL, Mi Z, Zhu Y, 2012. Research progress on mechanism of insect resistance to insecticides. *Sci. Sericul.*, 38(2): 322 – 328. [阮成龙, 米智, 朱勇, 2012. 昆虫抗药性机制研究进展. 蚕业科学, 38(2): 322 – 328]

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA, 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. Soc.*, 360(1): 1 – 16.

Tian YQ, Xu HH, 2003. Medical insect resistance. *Chin. J. Pest Control*, 19(12): 766 – 768. [田永清, 徐汉虹, 2003. 医学昆虫的抗药性. 医学动物防制, 19(12): 766 – 768]

Wang YJ, Qiu L, Ranson H, Lumjuan N, Hemingway J, Setzer WN, Meehan EJ, Chen L, 2008. Structure of an insect epsilon class glutathione S-transferase from the malaria vector *Anopheles gambiae* provides an explanation for the high DDT-detoxifying activity. *J. Struct. Biol.*, 164(2): 228 – 235.

(责任编辑: 马丽萍)